

FR 99 / 02133 09/786722

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **14 SEP. 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE  
PRIORITÉ**  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA REGLE  
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

02.02.1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 11204

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

75 09.03.98

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU  
26, Avenue Kléber  
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

237250 D17632 MIP

01 45 00 92 02

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Anticorps monoclonaux anti-protéine OZF et leurs applications dans le domaine diagnostique et thérapeutique

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1. INSTITUT CURIE

2. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

Forme juridique

Nationalité (s)

1. 2. Française

Adresse (s) complète (s)

1. 26, rue d'Ulm 75005 PARIS,

2. 3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16

Pays

FR

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 11 204

TITRE DE L'INVENTION : Anticorps monoclonaux anti-protéine OZF et leurs applications dans le domaine diagnostic et thérapeutique

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

1. INSTITUT CURIE
2. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

GOUBIN Gérard  
6 cité Bergère  
75009 Paris, FR

FERBUS Didier  
10, rue de Reims  
75013 Paris, FR

MULERIS Martine  
11, rue Geoffroy Saint  
Hilaire  
75005 Paris, FR


PROSPERI Marie-Thérèse  
11, rue du Pôle Nord  
75018 Paris, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

8 septembre 1998

CABINET REGIMBEAU

  
F. Regimbeau

ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-PROTEINE OZF ET LEURS  
APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DIAGNOSTIC ET THERAPEUTIQUE.

La présente invention concerne un anticorps monoclonal  
5 spécifique de la protéine OZF ainsi qu'une composition  
pharmaceutique comprenant ledit anticorps destinée à la  
prévention, le traitement ou le diagnostic de pathologie  
liée à l'expression anormale de protéine OZF telle que le  
cancer. L'invention comprend en outre des méthodes de  
10 détection de la protéine OZF ainsi que des méthodes de  
sélection de composés capable d'interagir avec la protéine  
OZF.

La plupart des protéines à motifs doigt à zinc sont  
caractérisées par leur capacité à se fixer sur des ARN ou  
15 des ADN. Ce motif doigt à zinc a été retrouvé dans des  
gènes contrôlant le développement, des gènes de facteur de  
transcription ou des gènes liés à la formation de tumeurs,  
attestant ainsi l'importance de cette structure doigt à  
zinc dans la régulation de l'expression des gènes.

20 Parmi les gènes codant pour ces protéines à motifs  
doigt à zinc, un gène codant pour une protéine constituée  
uniquement de motifs doigt à zinc, dénommé gène OZF (OZF  
pour « Only Zinc Fingers ») a été isolé (Le Chalony et al.,  
1994) et l'ADNc correspondant a été cloné et séquencé. La  
25 séquence d'acides aminés de la protéine putative codée par  
le gène OZF comporte 292 résidus d'acides aminés, dont 10  
motifs doigt à zinc de 28 résidus d'acides aminés, pour un  
poids moléculaire estimé de 33 kDa. L'analyse comparative  
de la protéine OZF a montré que le domaine contenant la  
30 structure doigt à zinc comporte de grandes homologies avec  
d'autres protéines à motifs doigt à zinc.

D'autre part, Ferbus et al. (Ferbus et al., 1996) ont  
pu mettre en évidence certaines caractéristiques de la  
protéine OZF à partir d'une protéine recombinante OZF  
35 produite chez E. coli. En particulier, ces auteurs ont  
montré que la protéine OZF recombinante était capable de  
fixer des ions de zinc, de l'ADN et de l'héparine. En

outre, ces auteurs ont également pu montrer, en utilisant un anticorps polyclonal obtenu à partir d'une protéine recombinante OZF fusionnée avec une protéine fixant le maltose (MBP) que la protéine OZF était exprimée dans des  
5 cellules mammaires humaines de type épithéliale, préférentiellement dans le noyau, alors qu'elle était très faiblement exprimée dans les cellules myoépithéliales et stromatiques de ce tissu mammaire. Ces auteurs ont également pu mettre en évidence que la protéine OZF était  
10 exprimée dans une lignée cellulaire tumorale établie à partir d'une tumeur de pancréas.

Les inventeurs ont mis en évidence de manière surprenante, en utilisant des anticorps polyclonaux anti-protéine OZF, que la protéine OZF était surexprimée dans  
15 des tumeurs primaires qui présentaient une amplification du gène OZF mais aussi dans des tumeurs primaires qui ne présentaient pas d'amplification du gène.

D'autre part, les inventeurs ont également mis en évidence que la surexpression de la protéine OZF dans ces  
20 tumeurs primaires était restreinte aux cellules tumorales.

Ces résultats montrent ainsi que la protéine OZF apparaît comme un marqueur de cellules tumorales.

L'obtention d'anticorps capables de reconnaître de manière spécifique la protéine OZF permettrait ainsi de  
25 détecter des cellules tumorales caractérisées par une expression anormale de protéine OZF.

Des anticorps polyclonaux anti-protéine OZF ont déjà été décrits (Ferbus et al., 1996). Ces anticorps ont été préparés par immunisation de lapins contre une protéine  
30 recombinante obtenue par fusion de la protéine OZF et de la protéine MBP, puis purifiés sur immunoabsorbant constitué de la protéine recombinante fusionnée OZF-MBP couplée sur colonne de sépharose 4B. Ces anticorps polyclonaux peuvent ainsi reconnaître plusieurs épitopes de la protéine OZF et  
35 en particulier certains épitopes communs aux protéines humaines ou de mammifères à motifs de doigt à zinc, compte

tenu de la grande homologie de séquence constatée entre la protéine OZF et d'autres protéines à motifs doigt à zinc.

Les inventeurs ont pu ainsi mettre en évidence des réactions non spécifiques obtenues avec certaines protéines à motifs de doigt à zinc pour ces anticorps polyclonaux.

Si ces anticorps polyclonaux peuvent s'avérer de spécificité suffisante pour des applications particulières telles que la détection de protéine OZF dans des cellules ou des tissus homogènes isolés, leur spécificité et éventuellement leur affinité pourraient s'avérer insuffisantes comme le reconnaissent d'ailleurs les auteurs de la publication décrivant ces anticorps polyclonaux. Ces auteurs précisent en effet dans leur conclusion qu'il serait nécessaire de disposer d'anticorps anti-OZF permettant d'identifier avec précision les types de cellules exprimant la protéine OZF. L'obtention de tels anticorps, dirigés contre un épitope spécifique de la protéine OZF humaine, permettrait sans aucun doute non seulement d'identifier les types de cellules exprimant normalement ou anormalement la protéine OZF mais également de rechercher les séquences nucléiques cibles de la protéine OZF, notamment nucléaires, et d'identifier les gènes susceptibles d'être régulés par la protéine OZF.

Ainsi, il existe aujourd'hui un besoin de disposer d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la protéine OZF humaine. Un tel anticorps pourrait non seulement être utile pour étudier et ainsi mieux connaître le rôle joué par la protéine OZF dans la régulation des gènes mais également serait utile au regard des résultats présentés par les inventeurs dans la présente invention, pour d'autres applications comme les applications thérapeutiques, diagnostics, notamment *in vivo* ou *in vitro* à partir d'échantillon biologique hétérogène, ou pour le ciblage de composés capables de moduler l'activité biologique de la protéine OZF.

La présente invention est basée sur la découverte de la possibilité d'obtenir par une approche particulière de

préparation un anticorps monoclonal caractérisé par une spécificité jamais encore obtenue antérieurement. Il a ainsi été découvert qu'en immunisant une souris avec une protéine OZF recombinante, il est possible d'obtenir un  
5 anticorps reconnaissant un épitope spécifique de la protéine OZF et qui ne reconnaît pas d'autres protéines à motifs doigt à zinc de mammifères.

Ainsi, la présente invention a pour objet un anticorps monoclonal ou un de ses fragments capables de se fixer  
10 spécifiquement sur un épitope de la protéine OZF.

On entend désigner par épitope dans la présente description, tout déterminant de la protéine responsable de l'interaction spécifique avec l'anticorps. Les déterminants épitopiques consistent habituellement en des groupes de  
15 molécules présentant des surfaces chimiquement actives telles que des acides aminés ou des chaînes latérales de sucres et ayant une structure tridimensionnelle spécifique et/ou une charge spécifique caractéristique.

Les fragments d'anticorps monoclonal selon l'invention comprennent tout fragment dudit anticorps monoclonal  
20 capable de se fixer sur l'épitope de la protéine OZF sur lequel se fixe l'anticorps monoclonal dont ledit fragment est issu. Des exemples de tels fragments incluent en particulier des anticorps monoclonaux simple chaîne ou des  
25 fragments monovalents Fab ou Fab' et des fragments divalents tels que  $F(ab')_2$ , qui possèdent la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal dont ils sont issus. Un fragment selon l'invention pourra également être un fragment Fv simple chaîne produit par des méthodes  
30 connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Skerra et al., 1988 et King et al., 1991.

Selon la présente invention, des fragments d'anticorps monoclonaux de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux tels que décrits précédemment par  
35 des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique. D'une autre manière les



fragments d'anticorps monoclonaux compris dans la présente invention peuvent être synthétisés par des synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc., ou peuvent être préparés  
5 manuellement en utilisant des techniques connues de l'homme de l'art et telles que décrites par exemple par Geysen et al., 1978.

En général, pour la préparation d'anticorps monoclonaux ou leurs fragments, on pourra se référer aux  
10 techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel « Antibodies » (Harlow et al., 1988) ou à la technique de préparation à partir d'hybridomes décrite par Kohler et Milstein en 1975.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent  
15 être obtenus par exemple à partir de cellule d'un animal immunisé contre la protéine OZF, ou un de ses fragments, comportant l'épitope reconnu spécifiquement par lesdits anticorps monoclonaux selon l'invention. Ladite protéine OZF, ou un de sesdits fragments, pourra notamment être  
20 produite, selon les modes opératoires usuels, par recombinaison génétique à partir d'une séquence d'acide nucléique contenue dans la séquence de l'ADNc codant pour la protéine OZF ou par synthèse peptidique à partir d'une  
séquence d'acides aminés comprise dans la séquence  
25 peptidique de la protéine OZF.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention pourront par exemple être purifiés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été immobilisée la protéine OZF ou un de ses fragments comportant l'épitope reconnu  
30 spécifiquement par lesdits anticorps monoclonaux selon l'invention.

De préférence, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la présente invention se fixe sur l'épitope linéaire ou conformationnel du domaine N-terminal de la  
35 protéine OZF humaine dont la séquence présente un faible taux d'homologie comparée avec les séquences d'autres protéines à motifs doigt à zinc.

De manière plus préférée, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention se fixe sur un épitope situé sur les deux premiers doigts à zinc, notamment sur les quinze premiers acides aminés, du domaine N-terminal de la protéine OZF telle que décrite par Le Chalony et al., 1994, aux figures 1B et 1C page 400.

Ainsi, l'invention concerne un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce que l'épitope de la protéine OZF est située sur la partie N-terminale.

L'invention comprend en outre un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps humanisés, chimériques ou anti-idiotypes.

Les anticorps monoclonaux humanisés selon l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art (Carter et al., 1992 ; Singer et al., 1992 et Mountain et al., 1992). De tels anticorps monoclonaux humanisés selon l'invention sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes de diagnostic *in vivo* et thérapeutiques.

Les anticorps monoclonaux ou leurs fragments de type chimérique selon l'invention peuvent être réalisés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par exemple, l'anticorps monoclonal chimérique pourra être réalisé en clonant un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable d'un anticorps monoclonal selon l'invention et une séquence codant pour la région constante d'anticorps humain. Un anticorps chimérique de l'invention codé par un tel gène recombinant sera par exemple une chimère souris-homme, la spécificité de cet anticorps étant déterminée par la région variable dérivée de l'ADN murin et son isotype déterminé par la région constante dérivée de l'ADN humain (Verhoeven et al., 1988).

Les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon la présente invention incluent également des anticorps anti-

idiotypes produits par des méthodes connues de l'homme de l'art (Cozenza, et al., 1976 et Harlow et al., 1988).

Sont également compris dans l'invention, les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon la présente invention  
5 obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique.

L'invention comprend également un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est marqué.

10 Les anticorps monoclonaux selon l'invention ou leurs fragments peuvent également, selon l'invention, se présenter sous forme d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les anticorps monoclonaux marqués selon l'invention ou  
15 leurs fragments incluent par exemple des anticorps dits immunoconjugués qui peuvent être conjugués par exemple avec des enzymes telles que la peroxydase, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -D-galactosidase, la glucose oxydase, la glucose amylase, l'anhydrase carbonique, l'acétyl-  
20 cholinestérase, le lysozyme, la malate déhydrogénase ou la glucose-6 phosphate déhydrogénase ou par une molécule comme la biotine, la digoxigénine ou la 5-bromo-désoxyuridine. Des marqueurs fluorescents peuvent être également conjugués aux anticorps monoclonaux ou leurs fragments de l'invention  
25 et incluent notamment la fluorescéine et ses dérivés, le fluorochrome, la rhodamine et ses dérivés, la GFP (GFP pour « Green Fluorescent Protein »), le dansyl, l'umbelliférone etc.. Dans de tels conjugués, les anticorps monoclonaux de l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par  
30 des méthodes connues de l'homme de l'art. Ils peuvent être couplés aux enzymes ou aux marqueurs fluorescents directement ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur ou d'un groupe de liaisons tel qu'un polyaldéhyde, comme le glutaraldéhyde, l'acide éthylènediaminetétraacétique  
35 (EDTA), l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DPTA), ou en présence d'agents de couplage tels que le périodate etc.. Les conjugués comportant des marqueurs de type

fluoréscéine peuvent être préparés par réaction avec un isothiocyanate.

D'autres conjugués peuvent inclure également des marqueurs chimioluminescents tels que le luminol et les dioxétanes ou des marqueurs bioluminescents tels que la luciférase et la luciférine.

Parmi les marqueurs pouvant être fixés sur l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention, on préfère également les marqueurs radioactifs tels que  $^{14}\text{C}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{75}\text{SE}$  et  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  qui peuvent être détectés par des moyens connus tels que le compteur gamma ou à scintillations, par autoradiographie, etc..

La présente invention comprend également les anticorps monoclonaux marqués ou leurs fragments selon l'invention dans lesquels le conjugué peut être un marqueur détectable choisi parmi les marqueurs pouvant être utilisés dans l'application imagerie in vivo. Des exemples de tels marqueurs selon l'invention sont  $^{72}\text{As}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{201}\text{Tl}$  et  $^{89}\text{Zr}$ .

Le terme « imagerie in vivo » doit être entendu dans la présente description comme toute méthode permettant la détection d'un anticorps monoclonal marqué selon la présente invention ou un de ses fragments qui se fixe spécifiquement sur l'épitope de la protéine OZF dans le corps du patient. Le patient sera de préférence un homme susceptible de présenter des cellules tumorales exprimant de manière anormale la protéine OZF.

La présente invention comprend également les anticorps monoclonaux marqués ou leurs fragments selon l'invention dans lesquels le conjugué peut être un marqueur choisi parmi les marqueurs paramagnétiques pouvant être utilisés dans l'application imagerie in vivo. De tels marqueurs selon l'invention sont par exemple les isotopes paramagnétiques particulièrement utilisés dans l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) et qui incluent notamment  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{157}\text{Gd}$  et  $^{55}\text{Mn}$ .

Tel que mentionné précédemment, pour la préparation de conjugués d'anticorps monoclonaux, le marqueur isotopique ou paramagnétique pourra être fixé sur l'anticorps selon l'invention ou un de ses fragments soit directement ou soit  
5 indirectement en utilisant un groupe fonctionnel intermédiaire. Selon l'invention, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments peut être marqué par toute technique connue de l'homme de l'art telle que par exemple celles décrites par Wagner et al., 1979 et Saha et al., 1976. Les  
10 conjugués monoclonaux radiomarqués selon la présente invention peuvent par exemple être iodinés par contact avec du iodure de sodium ou de potassium et d'un agent chimique oxydant tel que l'hypochlorite de sodium ou un agent oxydant enzymatique tel que la lactopéroxydase.

15 Le type de détection de l'instrument utilisé sera un facteur majeur dans la sélection du marqueur. Par exemple, les isotopes radioactifs ou paramagnétiques seront choisis, en particulier pour l'imagerie *in vivo*, en fonction du type d'instrument utilisé qui guidera la sélection de ces  
20 marqueurs. De préférence, les marqueurs radioactifs choisis devront avoir une période qui est détectable par le type d'instrument choisi. Ces anticorps monoclonaux pourront ainsi être utilisés par exemple comme agent d'imagerie, *in vivo* ou *ex vivo* sur des prélèvements biologiques dans toute  
25 méthode conventionnelle permettant de visualiser par image un diagnostic de pathologie lié à l'expression anormale de la protéine OZF. Ces agents d'imagerie ou les réactifs pour diagnostic *in vitro* caractérisés en ce qu'ils comprennent un anticorps monoclonal marqué selon l'invention ainsi que  
30 leurs utilisations dans des méthodes de diagnostic *in vitro* ou de diagnostic par imagerie *in vivo* pour le diagnostic de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF font bien entendu partie de la présente invention.

L'invention comprend également un anticorps monoclonal  
35 ou un de ses fragments selon l'invention, caractérisé en ce qu'il est couplé à un composé cytotoxique.

Les agents cytotoxiques qui peuvent être conjugués aux anticorps monoclonaux selon l'invention incluent notamment, mais sans s'y limiter, des composés alkylants tels que la méchloréthamine, la triéthylène phosphoramide, la triaziquone, la camustine, la sémustine, le méthotrexate, la mercaptopurine, la cytarabine, le fluorouracile, des antibiotiques tels que l'actinomycine, des hormones ou des antagonistes d'hormones tels que les corticostéroïdes, comme la prednisone ou les progestines. Les conjugués anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être préparés en conjuguant des substances cytotoxiques contenant soit la toxine intacte ou soit leur chaîne A dérivée avec l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon des techniques de l'homme de l'art (Chaudry et al., 1993 ; Sung et al., 1993 et Selvaggi et al., 1993).

L'anticorps monoclonal selon l'invention peut également être un anticorps monoclonal hétéroconjugué tel qu'une molécule hybride composée de deux ou plusieurs anticorps. Un hétéroconjugué inclut par exemple un anticorps monoclonal simple chaîne selon l'invention et un anticorps monoclonal simple chaîne qui est spécifique d'un récepteur cellulaire (Kerr et al., 1990 et Hsieh-Ma et al., 1992).

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique pour le traitement, la prévention ou pour le diagnostic *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments, selon l'invention; et
- b) un excipient pharmaceutiquement acceptable.

De préférence, la composition pharmaceutique selon l'invention, est caractérisée en ce que ladite pathologie est choisie parmi les cancers, notamment le cancer du pancréas et du colon.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement du cancer, notamment le cancer du pancréas ou le cancer du côlon.

En général, la dose d'anticorps monoclonaux marqués ou un de leurs fragments pour le diagnostic *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, pourra varier en fonction de paramètres tels que l'âge, les conditions, le sexe, de l'étendue de la maladie du patient, de contre-indications s'il en existe, de thérapies concomittantes ou d'autres variables qu'un homme de l'art saura ajuster.

L'administration de ces composés au patient peut être locale ou systémique et accomplie par voie intraveineuse, intra-artérielle, par l'intermédiaire du liquide spinal, etc.. L'administration peut être également effectuée par voie intradermique ou par voie intracavitaire, orale ou nasale, en fonction de la partie du corps qui doit être examinée. Après un temps suffisant permettant à l'anticorps monoclonal de se fixer sur la protéine OZF, par exemple de 30 minutes à 48 heures, on examine la partie du corps qui doit être examinée par les techniques d'imagerie classiques telles que l'IRM, ou l'imagerie par scintillation. Le protocole exact dépendra nécessairement de facteurs spécifiques liés au patient, de la partie du corps à examiner, de la méthode d'administration et du type des marqueurs utilisés. Les procédures spécifiques pourront être déterminées par l'homme de l'art. La distribution des isotopes radioactifs fixés et leur décroissance avec le temps sera ensuite enregistrée et contrôlée. En comparant les résultats obtenus avec ceux obtenus pour des individus cliniquement normaux, la présence et la localisation de cellules tumorales pourront être déterminées et contrôlées.

La quantité d'anticorps monoclonaux comprise dans les compositions pharmaceutiques selon la présente invention et nécessaire pour une thérapie efficace dépendra de

différents facteurs tels que le mode d'administration, la partie du corps ciblée, l'état physiologique du patient, de l'administration d'autres médicaments, des éventuels effets secondaires, etc.. Le dosage pour de telles préventions ou traitements thérapeutiques devra être réalisé de manière à optimiser sa sécurité et son efficacité. En général, les dosages utilisés *in vitro* peuvent fournir une indication pour les quantités utilisées pour l'administration d'anticorps monoclonaux *in situ* et ainsi des modèles animaux peuvent être utilisés pour déterminer les quantités efficaces d'anticorps monoclonaux selon l'invention pour le traitement de pathologie particulière. Ces méthodes sont en particulier discutées dans les ouvrages tels que Gilman et al. (1990) et Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) pour des méthodes d'administration telles que les méthodes par voie orale, intraveineuse, intrapéritonale, intramusculaire ou transdermique. Les excipients pharmaceutiquement acceptables incluent notamment l'eau, les solutions salines, les tampons ou tout autre composé décrit par exemple dans l'Index de Merck.

L'invention comprend en outre l'utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments pour le traitement, la prévention ou pour le diagnostic *in vitro* ou *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, notamment pour le traitement, la prévention ou le diagnostic de cancer comme le cancer du pancréas ou du côlon, ladite utilisation étant comprise dans l'invention.

L'invention concerne également une méthode de détection et/ou de dosage de la protéine OZF dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps monoclonal selon l'invention ; et
- b) la détection et/ou le dosage de la fixation dudit anticorps sur la protéine OZF contenue dans l'échantillon biologique.



Par ailleurs, les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'invention, peuvent également être utilisés pour l'identification, la localisation, notamment tissulaire ou cellulaire, et/ou le dosage de la protéine OZF, ladite utilisation étant comprise dans l'invention.

Les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'invention constituent également un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression de la protéine OZF sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, par marquage enzymatique, radioactif ou à l'or. Ils permettent notamment de mettre en évidence et de quantifier la présence spécifique normale ou anormale de la protéine OZF dans les tissus ou prélèvements biologiques, ce qui les rend utiles pour l'identification et la localisation de l'expression de la protéine OZF, pour le diagnostic de pathologies liées à la présence anormale de la protéine OZF mais également pour le suivi de l'évolution de méthodes de prévention ou de traitement de pathologie nécessitant ladite détection ou ledit dosage.

Plus généralement, les anticorps monoclonaux ou leurs fragments selon l'invention peuvent être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression de la protéine OZF doit être observée de manière qualitative et/ou quantitative.

De préférence, l'échantillon biologique est constitué par un fluide biologique, tel que le sérum, le sang total, des cellules, un échantillon de tissu ou des biopsies d'origine humaine.

Toute procédure ou test classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection et/ou dosage. Ledit test peut être un test par compétition ou par sandwich, ou tout test connu de l'homme de l'art dépendant de la formation d'un complexe immun anticorps-antigène. Suivant les applications selon l'invention, l'anticorps monoclonal ou un de ses fragments peut être immobilisé ou marqué. Cette immobilisation peut être réalisée sur de

nombreux supports connus de l'homme de l'art. Ces supports peuvent notamment inclure le verre, le polystyrène, le polypropylène, le polyéthylène, le dextran, le nylon, ou des celluloses naturelles ou modifiées. Ces supports  
5 peuvent être soit solubles ou insolubles.

A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-immunologique (RIA) ou équivalent.

10 L'invention comprend également une trousse pour la détermination de la présence de protéine OZF dans un échantillon biologique comprenant un anticorps ou un de ses fragments selon l'invention.

Entre également dans le cadre de l'invention, une  
15 trousse pour la détection et/ou le dosage de la protéine OZF selon l'invention dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention ;
- 20 b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

25 Sous un dernier aspect, l'invention a pour objet une méthode pour évaluer l'affinité d'un composé à tester pour la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon contenant ladite protéine OZF avec
  - 30 i) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'invention; et
  - ii) ledit composé à tester ; et
- b) la mesure de la quantité dudit anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments, ladite quantité étant inversement  
35 proportionnelle à la quantité de composés à tester fixés sur ladite protéine OZF.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention ou leurs fragments peuvent être utilisés également dans des méthodes *in vitro* pour la sélection de composés susceptibles de se fixer à la protéine OZF avec l'affinité recherchée. Ainsi, la présente invention comprend également des méthodes de sélection par compétition de composés pharmaceutiques dans lesquelles les anticorps monoclonaux de l'invention ou leurs fragments entrent en compétition avec le composé à tester susceptible de se fixer à la protéine OZF. De cette manière, l'anticorps monoclonal ou ses fragments est utilisé pour détecter la présence de tout composé tel qu'un polypeptide ou tout autre composé organique qui peuvent présenter un ou plusieurs sites de reconnaissance de l'épitope de la protéine OZF reconnu par les anticorps selon l'invention. Ainsi ces composés, identifiés par la méthode selon l'invention pourront être utilisés pour occuper ces sites de fixation sur la protéine OZF et agir en tant qu'agent modulateur ou antagoniste de l'activité biologique de la protéine OZF.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

## 25 LEGENDES DES FIGURES

FIGURES 1A et 1B. Analyse par Southern blot de lignées cellulaires pancréatiques et de tumeurs primaires.

Figure 1A : Hybridation par Southern blot des ADN totaux génomiques de placenta et de douze lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques digérés par BgIII. Trois lignées cellulaires, AICPC-1, BxPC-3, Su.86.86 présentent une co-amplification d'OZF avec RAC. PANC-1 présente une amplification de RAC uniquement.

Figure 1B : Hybridation par Southern blot de l'ADN total génomique de AICPC-1 (figure 1A), de placenta (P) et de douze tumeurs primaires d'adénocarcinomes pancréatiques

digérées par BgIII. La comparaison des intensités des signaux d'hybridation d'OZF avec ceux obtenus après réhybridation avec une sonde N-myc montre une augmentation du nombre de copies du gène dans les échantillons tumoraux  
 5 T6 et T9.

FIGURE 2. Expression de l'ARNm d'OZF dans les lignées cellulaires pancréatiques. L'ARN, des douze lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques analysées par  
 10 Southern blot dans les figures 1A et 1B, était analysé par Northern blot avec une sonde d'ADNc contenant la phase ouverte de lecture d'OZF. AICPC-1, BxPC-3, Su.86.86 ayant OZF amplifié, présentent un haut niveau d'expression. De hauts niveaux d'expression d'OZF sont observés en absence  
 15 d'amplification dans Capan-1, -2, MIA PaCa-2 et PANC-1. L'absence ou une très faible expression a été observée dans un échantillon de pancréas normal adulte (Clontech). Le gel correspondant, coloré avant transfert au bromure d'éthidium, est montré en dessous, avec les bandes d'ARN  
 20 ribosomiques 28S et 18S.

FIGURES 3A, 3B et 3C. Analyse par Western blot de lignées cellulaires pancréatiques et de tumeurs primaires. Des quantités identiques de protéine (10 µg), déterminées par  
 25 coloration des extraits après électrophorèse sur gel SDS (non montré) ont été transférées sur nitrocellulose. La nitrocellulose a été alors bloquée et hybridée avec un anticorps polyclonal anti-OZF.

Figure 3A : Lignées cellulaires pancréatiques précédemment analysées par Southern et Northern blot (figure 1A et  
 30 figure 2).

Figure 3B : Immunotransfert d'OZF d'échantillons de tumeurs primaires d'adénocarcinomes pancréatiques.

Figure 3C : Immunotransfert d'OZF de pancréas normal humain. Les protéines ont été extraites dans les mêmes conditions pour les quatre échantillons indépendants de  
 35 pancréas normaux (P1-P4), la lignée MIA PaCa-1 (MP) et pour

un carcinome pancréatique (T6) exprimant OZF. La nitrocellulose a été hybridée avec des anticorps polyclonaux anti-OZF et anti-pag afin de vérifier l'intégrité des protéines. Les anticorps anti-pag sont des anticorps de poule purifiés dans les mêmes conditions que les anti-OZF.

FIGURES 4A, 4B et 4C. Détection par immunohistochimie d'OZF dans les carcinomes pancréatiques humains. La coloration à la peroxydase a été obtenue avec un anticorps anti-OZF purifié par affinité. Les anticorps anti-OZF montrent une coloration granulaire nucléaire dans les cellules AICPC-1 greffées chez la souris athymique (figure 4A), dans un adénocarcinome exprimant OZF (figure 4B), et l'absence de coloration dans du pancréas sain n'exprimant pas OZF (figure 4C) (grossissement : 1000X).

FIGURE 5. Analyse par Western blot d'extraits bruts de cellules humaines 293 non transfectées et transfectées par un vecteur d'expression OZF. Détection de la protéine OZF endogène (à gauche) et après détection transitoire par un vecteur d'expression du gène OZF (à droite) en triplicate, avec un anticorps monoclonal anti-OZF et un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase, par chimio-luminescence.

FIGURE 6. Marquage immunocytochimique de la protéine OZF dans les cellules de la lignée AICPC-1 issue d'un adénocarcinome pancréatique surexprimant la protéine OZF. Les cellules sont cultivées sur lamelle, fixées par 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS, puis perméabilisées par 0,1 % de triton X100. Les sites non spécifiques sont saturés par 2 % de BSA. Les cellules sont incubées 1hr avec l'anticorps monoclonal anti-OZF (1/200), lavées puis mises en contact 30 mn avec le second anticorps anti-souris couplé à un fluorochrome, lavées et incubées 4 mn au DAPI (0,2 µg/ml) qui marque spécifiquement les noyaux (photos de gauche). Un

marquage nucléaire spécifique d'OZF est observé (photos de droite). A faible grossissement en haut et à fort grossissement en bas.

5 **FIGURE 7. Expression du gène OZF dans les cancers du côlon. Analyse par Western blot.**

A l'aide des anticorps monoclonaux, nous avons examiné l'expression de la protéine OZF dans les cancers du côlon. L'étude a porté sur 16 échantillons coliques. Sur les 16  
10 échantillons, 10 proviennent d'une tumeur colique (T1 - T3 - T5 - T6 - T7 - T8 - T9 - T10 - T11 - T12), et 6 de muqueuses coliques saines (C2 - C4 - C5 - C6 - C8 - C12). Les échantillons T5 et C5 proviennent d'un même patient, de même que T6 - C6, T8 - C8, et T12 - C12. Nous avons déposé  
15 dans les puits d'électrophorèse des quantités équivalentes de protéine pour chaque échantillon colique, les échantillons sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de PVDF. La protéine OZF est révélée par l'anticorps monoclonal  
20 anti-OZF et un anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase.

Dans les quatre cas où nous avons un échantillon colique sain et un échantillon colique cancéreux prélevés chez une même personne, nous avons constaté une accumulation plus  
25 importante de la protéine OZF dans le tissu tumoral que dans le tissu normal.

En comparant la quantité de protéine OZF accumulée, nous constatons que les tissus tumoraux T1 - T3 - T5 - T7 - T8 - T9 - T10 - T12 présentent une quantité supérieure de  
30 protéine OZF par rapport aux tissus sains.

### EXEMPLES

#### Matériels et méthodes

35

Echantillons tumoraux et lignées cellulaires. Onze lignées de cellules d'adénocarcinomes de pancréas ont été obtenues

de l'American Type Culture Collection (Rockville, USA) et cultivées comme prescrit par le fournisseur. Une lignée cellulaire additionnelle (AICPC-1) a été établie au laboratoire à partir de la tumeur primitive d'une patiente  
5 âgée de soixante ans atteinte d'un adénocarcinome du pancréas. Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dubelcco modifié supplémenté avec 20 % (vol/vol) de sérum de veau foetal. Des tissus tumoraux ont aussi été obtenus de patients atteints de carcinome primaire du pancréas  
10 exocrine (n = 13 ; 6 hommes et 7 femmes).

Analyse par Southern et par Northern blot. L'extraction d'ADN a été effectuée suivant les méthodes standards pour les lignées cellulaires et pour les tumeurs congelées  
15 (Sambrook et al., 1989). Les fragments obtenus après digestion de l'ADN génomique (5 µg) avec l'endonucléase BgII ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 %, transférés sur nitrocellulose (BA85, Schleicher et Schuell) et hybridés avec des sondes marquées au P32 (Le  
20 Chalony et al., 1996). Les lignées de cellules tumorales ont été hybridées avec une sonde OZF obtenue après amplification par PCR à l'aide d'amorces internes pour générer un fragment de 1 kb contenant toute la phase ouverte de lecture (847-1840). Les carcinomes pancréatiques  
25 primaires ont été hybridés avec un fragment cloné XbaI/Scal (652-1852) (Le Chalony et al., 1994). La sonde RAC (2,2 kb) a été préparée à partir d'un clone pUC-RAC à l'aide d'amorces universelles situées de part et d'autre du site multiple de clonage (Cheng et al., 1992). L'évaluation  
30 quantitative des signaux d'hybridation a été faite au phosphorimager (BioRad). Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit Rneasy (Qiagen). Pour les analyses en Northern blot, 10 µg d'ARN ont été déposés sur gel d'agarose 1 % / 2,2 M formaldéhyde, transférés après  
35 migration sur membrane de nitrocellulose (BA85, Schleicher et Schuell) et hybridés avec la sonde XbaI/Scal.

Production des anticorps. Les antisérums ont été développés chez la poule en utilisant la protéine OZF purifiée comme immunogène (Ferbus et al., 1996). Les immunoglobulines IgY de jaune d'oeuf de poule ont été préparés comme décrit  
5 (Akita et al., 1992). Les anticorps spécifiques ont été obtenus à partir des IgY anti-OZF après purification par affinité sur une colonne de MBP-OZF couplé au sépharose 4B (Pharmacia) (Ferbus et al., 1996). La spécificité des anticorps anti-OZF a été vérifiée par immunoelectrophorèse.  
10 Une bande unique de 33 kDa a été observée dans les extraits nucléaires des cellules exprimant OZF.

Méthode de préparation de l'anticorps monoclonal. La protéine recombinante de fusion MBP-OZF produite chez E.  
15 coli a été purifiée sur colonne d'amylose par affinité pour le MBP (Ferbus et al., 1996). Des souris ont été immunisées avec la protéine MBP-OZF purifiée. Après le test de criblage en ELISA, nous avons sélectionné pour l'étape de fusion la souris qui présentait la meilleure réponse. Les  
20 leucocytes spléniques ont été fusionnés avec les cellules de la lignée myélomateuse P3X63/8.653. Le clonage des hybridomes s'est fait par la technique de «secretion capture report web» (Kenney et al., 1995).

25 Les immunoglobulines produites sont des Ig G1.

L'anticorps monoclonal spécifique de la protéine OZF humaine reconnaît celle-ci à l'état natif ou dénaturé (en  
30 ELISA, en Western, en immunohistochimie, par immuno-précipitation).

L'épitope de reconnaissance se situe au niveau de son extrémité NH<sub>2</sub> terminale. Il reconnaît en effet la protéine OZF recombinante tronquée, ne possédant que les deux premiers doigts à zinc, et ne reconnaît pas la protéine  
35 murine homologue qui diffère de la protéine humaine au niveau de ses quinze premiers acides aminés.



Extraction des protéines et analyse par Western blot. Les échantillons tumoraux congelés et les extraits cellulaires ont été solubilisés dans du tampon SDS en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et chauffés à ébullition 5 minutes. Des quantités égales de protéines (10  $\mu$ g) ont été chargées sur gel SDS polyacrylamide 12 % et transférés après migration sur membrane de PDVF (Amersham). Les membranes ont été hybridées avec les anticorps anti-OZF puis avec des anti-poules de lapin conjugués à la phosphatase alcaline (Sigma), dilués respectivement 200 et 15 000 fois. La chimioluminescence a été produite par incubation de la membrane avec du CDP star (Dupont) et la protéine a été révélée par autoradiographie sur un film X-OMAT AR5.

Marquage immunohistochimique d'OZF. La coloration a été obtenue par un anti-poule couplé à la peroxydase après incubation avec un antisérum anti-OZF de poule purifié, sur des coupes de tissu congelé (5  $\mu$ m) comme décrit (Terris et al., 1995).

#### EXEMPLE 1 : Amplification du gène OZF dans les lignées d'adénocarcinomes pancréatiques

Pour évaluer le nombre de copies du gène OZF dans les cellules des lignées tumorales et déterminer s'il appartient à l'amplicon portant le gène RAC, les ADN génomiques totaux, de 12 lignées cellulaires et d'un placenta, ont été digérés avec l'enzyme de restriction BgIII, séparés sur gel d'agarose et hybridés par Southern blot avec des sondes ADN OZF et RAC. Comme montré dans la figure 1A, trois lignées, AICPC-1, BxPC-3, SU.86.86 présentent un signal d'amplification dans un fragment génomique BgIII de taille de 5,3 kb. La quantification des niveaux d'amplification révèle que le gène OZF est approximativement de 60 copies, 6 copies et 30 copies dans AICPC-1, BxPC-3, SU.86.86 respectivement. La co-amplification avec RAC est observée dans ces trois lignées, cependant PANC-1 montre une amplification de RAC seule. Le

nombre de copies des gènes RAC et OZF est similaire dans BxPC-3. L'intensité relative du signal d'amplification est supérieure pour le gène OZF que pour RAC dans AICPC-1 et inférieure dans SU.86.86. Ces expériences montrent que le  
 5 gène OZF est coamplifié avec RAC dans trois des quatre lignées cellulaires. Contrairement à ce qui avait été reporté, l'amplification de RAC dans la lignée AsPC-1 n'est pas détectée (Cheng et al., 1996 ; Miwa et al., 1996). Les analyses caryotypiques des lignées cellulaires ont confirmé  
 10 la ploïdie et la spécificité du marquage chromosomique de chaque lignée incluant AsPC-1 (Curtis et al., à paraître). L'amplification précédemment décrite dans AsPC-1 peut être due à un sous clone ou avoir été perdue pendant la propagation en culture.

15 L'état d'amplification d'OZF a été examiné dans des échantillons tumoraux. Douze adénocarcinomes primaires pancréatiques, pris au hasard, ont été analysés par Southern blot avec une sonde OZF (figure 1B). Deux tumeurs (T6 et T9) présentent une augmentation du signal  
 20 d'hybridation (de 3 à 5 fois) par rapport à l'ADN placentaire, après normalisation avec le signal obtenu après réhybridation avec une copie unique du gène N-myc. Ce signal est considéré comme significatif pour l'amplification étant donné la forte proportion de cellules non  
 25 tumorales dans les tissus tumoraux.

#### **EXEMPLE 2 : Expression d'OZF dans les lignées pancréatiques et dans les échantillons tumoraux**

L'expression d'OZF a été examinée en premier dans les  
 30 lignées tumorales par Northern blot (figure 2). Différents niveaux d'expression ont été détectés dans toutes les lignées. Les lignées AICPC-1 et SU.86.86 qui présentent les plus hauts niveaux d'amplification expriment les plus hauts niveaux de mRNA OZF. Une expression modérée est observée  
 35 dans BxPC-3, Capan-1, Capan-2, MIAPaCa-2 et PANC-1, et une plus faible expression est trouvée dans les quatre lignées restantes.

L'expression d'OZF a été aussi recherchée au niveau protéique par Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine OZF recombinante exprimée chez E.coli (Ferbus et al., 1996). La protéine OZF a été détectée dans toutes les lignées cellulaires (figure 3A). Le plus haut niveau de la protéine est trouvé dans les lignées cellulaires qui présentent une amplification du gène OZF (AICPC-1, BxPC-3 et SU.86.86). Comme le tissu pancréatique présente des ARN souvent dégradés, l'expression d'OZF a été étudiée dans les tumeurs et le pancréas normal par la détermination de l'accumulation de sa protéine. Afin de comparer le taux de la protéine OZF dans le pancréas normal adulte avec ceux trouvés dans les tumeurs, les protéines de quatre échantillons pancréatiques différents ont été extraites selon le protocole standard et analysées par Western blot (figure 3C). L'intégrité des extraits a été contrôlée par l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ubiquitaire PAG de 22 kDa qui est exprimée dans les cellules en prolifération (Prospéri et al., 1993). Parmi les huit échantillons d'adénomes pancréatiques primaires étudiés, trois présentent un faible niveau de la protéine OZF comme dans les échantillons de pancréas sains. Cinq tumeurs (T6-T9, T12) présentent les plus hauts niveaux d'OZF (figures 3B et 3C). Par conséquent le gène OZF est exprimé à hauts niveaux dans plus de la moitié des adénocarcinomes analysés.

### **EXEMPLE 3 : Restriction de l'expression d'OZF aux cellules tumorales dans les tumeurs pancréatiques**

L'utilisation possible d'anticorps anti-OZF dans des études immunohistochimiques a été déterminée. L'expression d'OZF a été détectée (figure 4A) dans une tumeur obtenue après greffe des cellules AICPC-1 chez la souris athymique. L'immunohistochimie a été effectuée sur des coupes de carcinomes pancréatiques congelés afin de déterminer si d'autres types cellulaires en plus des cellules tumorales, contribuent à l'expression d'OZF. Un exemple de carcinome

pancréatique montrant une expression d'OZF est montré en figure 4B. Les anticorps anti-OZF révèlent par coloration une granulation nucléaire qui prédomine dans les cellules tumorales. Les autres types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules endothéliales présentent une très faible ou une absence de coloration. Ainsi dans les tumeurs pancréatiques l'expression d'OZF est restreinte principalement aux cellules tumorales et les anticorps anti-OZF peuvent être utilisés pour détecter les cellules tumorales dans des tumeurs pancréatiques hétérogènes.

#### EXEMPLE 4 : Expression du gène OZF dans les cancers du côlon

A l'aide des anticorps monoclonaux, l'expression de la protéine OZF a été examinée dans les cancers du côlon. L'étude a porté sur 16 échantillons coliques. Sur les 16 échantillons, 10 proviennent d'une tumeur colique (T1 - T3 - T5 - T6 - T7 - T8 - T9 - T10 - T11 - T12), et 6 de muqueuses coliques saines (C2 - C4 - C5 - C6 - C8 - C12). Les échantillons T5 et C5 proviennent d'un même patient, de même que T6 - C6, T8 - C8, et T12 - C12.

##### Analyse par Western blot :

Des quantités équivalentes de protéine pour chaque échantillon colique sont déposées dans les puits d'électrophorèse. Les échantillons sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de PVDF. La protéine OZF est révélée par l'anticorps monoclonal anti-OZF et un anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase. Le résultat est présenté figure 7.

Dans les quatre cas où l'échantillon colique sain et l'échantillon colique cancéreux sont prélevés chez une même personne, une accumulation plus importante de la protéine OZF est constatée dans le tissu tumoral que dans le tissu normal.

En comparant la quantité de protéine OZF accumulée, on constate que les tissus tumoraux T1 - T3 - T5 - T7 - T8 -

T9 - T10 - T12 présentent une quantité supérieure de protéine OZF par rapport aux tissus sains.

D'après les résultats, 50 % des tissus cancéreux analysés présentent une forte surexpression d'OZF et 80 % des échantillons tumoraux analysés ont un niveau d'expression de la protéine OZF supérieur à celui observé dans les tissus normaux. Ces observations montrent que le gène OZF est surexprimé dans les cancers du côlon.

10 Les résultats obtenus dans les exemples précédents montrent que l'amplification du gène OZF a été observée dans 3 des 12 lignées d'adénocarcinomes du pancréas (AICPC-1, BxPC-3 et SU.86.86). L'augmentation du nombre de copies du gène a été aussi trouvée dans 2 des 12 échantillons de  
15 tumeurs primaires (T6 et T9), quoiqu'à des niveaux plus faibles que ceux observés dans les lignées. Parce que les tumeurs primaires pancréatiques contiennent généralement un large excès de cellules normales, l'hybridation du signal en Southern blot peut avoir été atténuée dans les tumeurs  
20 T6 et T9. De plus, les échantillons contenant peu de cellules tumorales, présentant un signal d'amplification modéré, échappent à la détection. Les xénogreffes sur souris athymiques devraient nous permettre une meilleure estimation de l'amplification du gène OZF dans les tumeurs  
25 pancréatiques primaires. En addition à ces résultats, l'amplification d'OZF a été identifiée par hybridation in situ en fluorescence dans la tumeur utilisée pour générer la lignée AICPC-1 (Curtis et al., à paraître). Ainsi, l'amplification d'OZF a lieu dans les tumeurs pancréatiques  
30 primaires et dans les lignée cellulaires.

Toutes les lignées d'adénocarcinomes pancréatiques expriment l'ARNm et la protéine OZF mais à des niveaux différents. Les plus hauts niveaux d'ARNm d'OZF ont été trouvés dans les lignées ayant amplifié le gène OZF (AICPC-1, BxPC-3 et SU.86.86). Quoique l'estimation de la protéine  
35 peut être moins précise, le taux de la protéine OZF a été comparé dans les deux tumeurs primaires présentant une

amplification du nombre de copies (T6 et T9), à la lignée cellulaire MIAPaCa-2. Les deux tumeurs expriment de hauts niveaux de protéines OZF. Ainsi, le gène OZF qui est hautement exprimé dans toutes les tumeurs pancréatiques présentant une amplification, n'est pas inactivé dans l'amplicon 19q13.1.

L'amplification génique est un mécanisme important pour l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la cancérogenèse même si la surexpression est souvent observée en absence d'amplification. Les études d'expression de quatre échantillons indépendants de pancréas normaux et de trois échantillons de tumeurs primaires montrent des niveaux de protéines OZF très faibles ou indécelables. Au contraire, toutes les lignées expriment OZF et quatre d'entre elles montrent de hauts niveaux d'ARNm OZF en absence d'amplification. Le cas le plus significatif est celui de la lignée PANC-1 qui possède deux copies du gène OZF et exprime un haut niveau d'ARNm de 2 à 4 fois plus bas que celui de la lignée SU.86.86 qui possède 30 copies du gène OZF. De hauts niveaux de protéine OZF sont aussi observés dans des tumeurs primaires sans amplification du gène OZF, et l'immunohistochimie montre que la protéine OZF est détectée essentiellement dans les cellules tumorales. En dehors du statut d'amplification génique, OZF est surexprimé dans 7 des 12 lignées tumorales et dans 5 des 8 tumeurs primaires. Les plus hauts niveaux d'expression d'OZF dans un large échantillon de tumeurs comparé au pancréas normal suggèrent que ce gène est impliqué dans le processus oncogénique. De plus il pourrait être utilisé comme un marqueur pour détecter de rares cellules tumorales dans le pancréas.

En dehors du gène OZF, la région q13.1 du chromosome 19 comprend plusieurs gènes candidats. Le mieux caractérisé est le gène RAC, localisé à proximité d'OZF, qui code pour une sérine-thréonine kinase (The Human Gene Map, 1997). Les deux gènes sont coamplifiés dans les lignées cellulaires, cependant seul le gène RAC a été trouvé amplifié dans PANC-

1. Cependant, dans la lignée PANC-1, dans laquelle le gène RAC est amplifié, les niveaux d'ARNm sont seulement légèrement plus bas que ceux observés dans les lignées cellulaires qui présentent une amplification du gène OZF.

5 Cette lignée cellulaire contient aussi une protéine OZF abondante. Ainsi, la surexpression d'OZF dans PANC-1 peut être due à un mécanisme autre que l'amplification génique comme dans le cas d'autres gènes connus. Par exemple dans les cancers du sein et de l'ovaire, la prévalence de la

10 surexpression HER2/neu intervient plus fréquemment que l'amplification et a été utilisée pour prédire le taux de survie (Slamon et al., 1989).

Bibliographie

- 5 Akita, E.M. and Nakai, S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification, J. Food Sci., 57: 629-634, 1992.
- Carter, et al. PNAS 89: 4285-4289, 1992.
- 10 Chaudry, et al. J. Biol. Chem., 268: 9437-9441, 1993.
- 15 Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tschlis, P.N. and Testa, J. R. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a family of protein-serin/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9267-9271, 1992.
- 20 Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K. and Testa, J.R. Amplification of AKT2 in human pancreatic cancer cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3636-3641, 1996.
- 25 Cozenza, et al. Eur. J. Immunol., 6: 114, 1976.
- 30 Ferbus, D., Le Chalony, C., Prosperi, M.T., Muleris, M., Vincent-Salomon, A. and Goubin, G. Identification, nuclear localisation, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs. Europ. J. Biochem., 236: 991-995, 1996.
- Geysen, et al. J. Immunol. Methods, 102: 259-274, 1978.
- 35 Gilman, et al. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8<sup>th</sup> Ed. Pergamon Press, 1990.



- Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications pp. 726, 1988.
- Hsieh-Ma, et al. *Cancer Res.*, 52: 6832-6839, 1992.
- 5 Kenney, et al. Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web. *Bio/technology*, 13: 787-790, 1995.
- 10 Kerr, et al. *J. Immun.*, 144: 4060-4067, 1990.
- King, et al. *Biochemical J.*, 290: 723-729, 1991.
- Köhler et Milstein. *Nature*, 256: 495-497, 1975.
- 15 Le Chalony, C., Prosperi, M.T., Haluza, R., Apiou, F., Dutrillaux, B. and Goubin, G. The OZF gene encodes a protein consisting essentially of zinc finger motifs. *J. Mol. Biol.*, 236: 399-404, 1994.
- 20 Le Chalony, C., Apiou, F., Pibouin, L., Dutrillaux, B. and Goubin G. Constitutive amplification of a zinc finger protein gene in cattle. *DNA and Cell Biol.* 15: 83-88, 1996.
- 25 Miwa, W., Yasuda, J., Murakami, Y., Yashima, K., Sugano, K., Sekine, T., Kono, A., Egawa, S., Yamaguchi, K., Hayashizaki, Y. and Sekiya, T. Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1 -q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 225: 968-974, 1996.
- 30 Mountain, et al. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 1-142, 1992.
- 35 Prospéri, M.T., Ferbus, D., Karczynski, I. and Goubin G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with

amoebic and bacterial proteins. J. Biol. Chem. 268: 11050-11056, 1993.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., 1990.

5 Saha, et al. J. Nucl. Med. 6: 542, 1976.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

10

Singer, et al. J. Immun. 150: 2844-2857, 1992.

Selvaggi, et al. J. Immuno-therapy, 13: 201-207, 1993.

15 Skerra et al. Science, 240: 1038-1041, 1988.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science, 244: 707-712, 1989.

20

Sung, et al. J. Cancer Res. 53: 2092-2099, 1993.

25 Terris, B., Baldin, V., Dubois, S., Degott, C., Fléjou, J.F., Hénin, D. and Dejean, A. PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. Cancer Res. 55: 1590-1597, 1995.

30 The Human Gene Map (1997) The National Center for Biotechnology Information, The National Institutes of Health, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96/>.

35 Verhoeyn, et al. BioEssays, 8: 74, 1988.

Wagner, et al. J. Nucl. Med., 20: 428, 1979.

REVENDICATIONS

1/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments capables de se fixer spécifiquement sur un épitope de la protéine OZF.

2/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'épitope de la protéine OZF est situé sur la partie N-terminale.

3/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps humanisés, chimériques, anti-idiotypes.

4/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est marqué.

5/ Anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est couplé à un composé cytotoxique.

6/ Composition pharmaceutique pour le traitement, la prévention ou pour le diagnostic *in vivo* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 5 ; et
- b) un excipient pharmaceutiquement acceptable.

7/ Composition pharmaceutique selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite pathologie est choisie parmi les cancers, notamment le cancer du pancréas et du côlon.

8/ Utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 5, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention du cancer, notamment le cancer du pancréas ou le cancer du côlon.

9/ Utilisation d'un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 4, pour le diagnostic *in vitro* de pathologie liée à l'expression anormale de la protéine OZF.

10/ Méthode de détection et/ou de dosage de protéine OZF dans un échantillon biologique caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- 5 a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4 ; et  
b) la détection et/ou le dosage de la fixation dudit anticorps sur la protéine OZF contenue dans l'échantillon biologique.

10 11/ Trousse pour la détermination de la présence de protéine OZF dans un échantillon biologique comprenant un anticorps ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 4.

15 12/ Méthode d'évaluation de l'affinité d'un composé pour la protéine OZF caractérisée en ce qu'elle comprend :  
a) la mise en contact d'un échantillon contenant ladite protéine OZF avec

- i) un anticorps monoclonal ou un de ses fragments selon l'une des revendications 1 à 4 ; et  
ii) ledit composé à tester ; et  
20 b) la mesure de la quantité dudit anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments, ladite quantité étant inversement proportionnelle à la quantité de composés à tester fixés sur ladite protéine OZF.

25

**ORIGINAL**

**CABINET REGIMBEAU**  
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
26, Avenue Kléber  
75116 PARIS

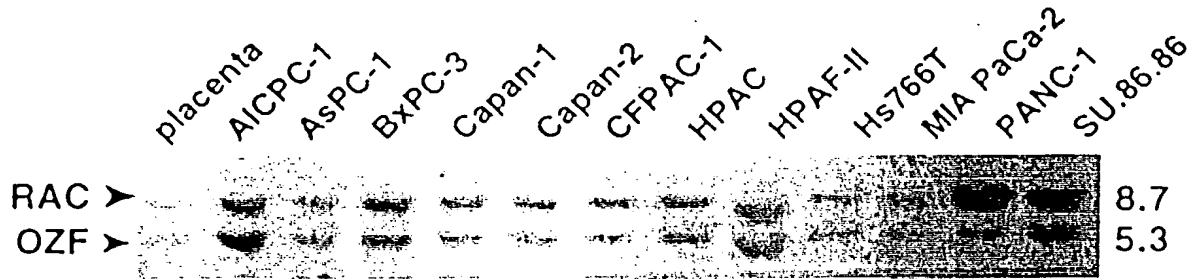


FIGURE 1A

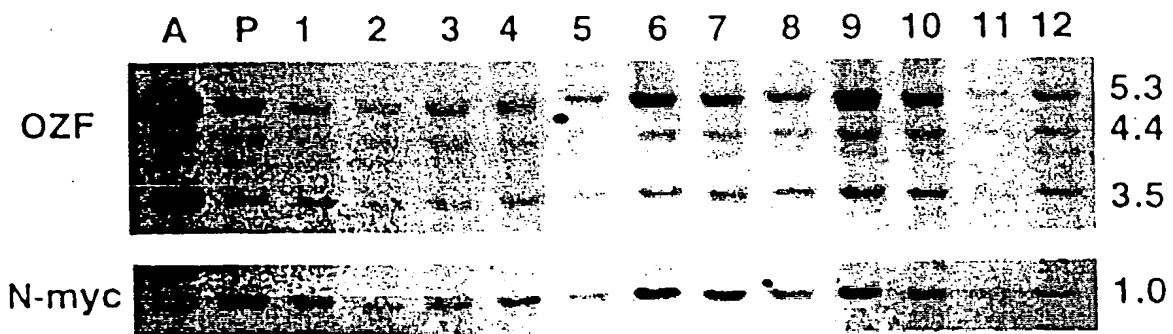


FIGURE 1B

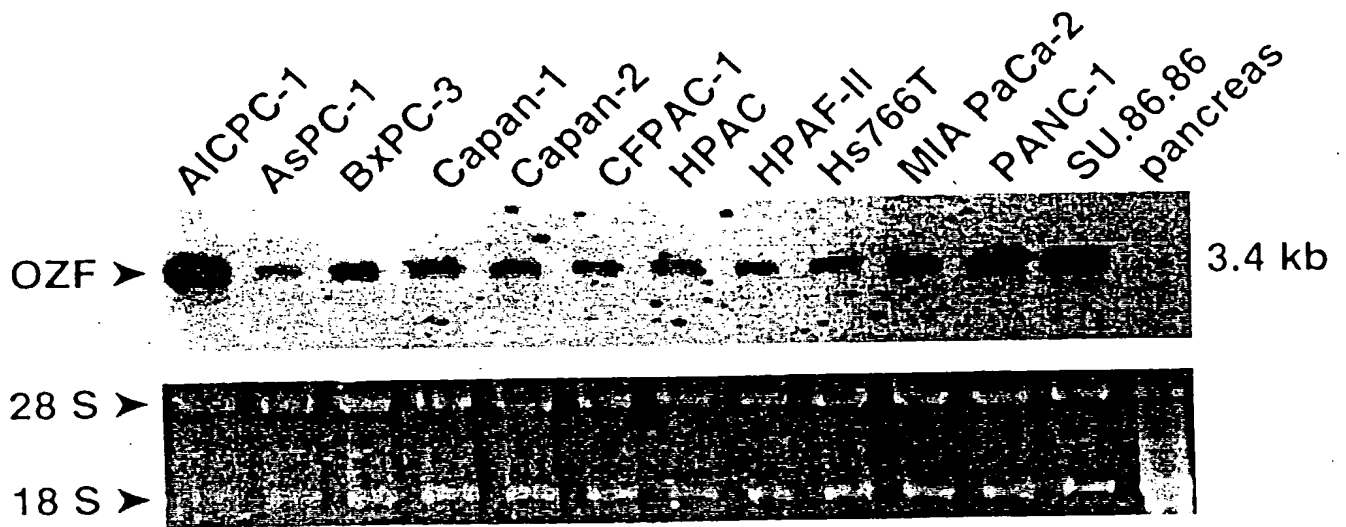


FIGURE 2

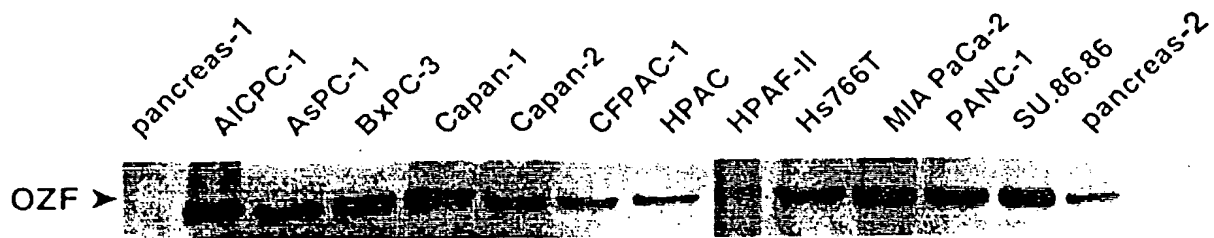


FIGURE 3A



FIGURE 3B

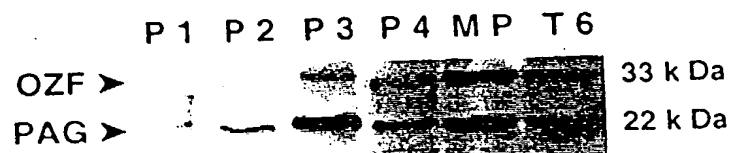


FIGURE 3C

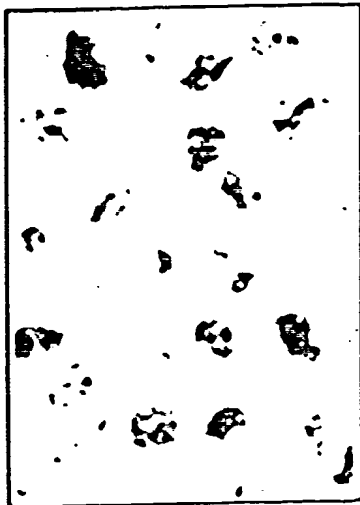


FIGURE 4A



FIGURE 4B

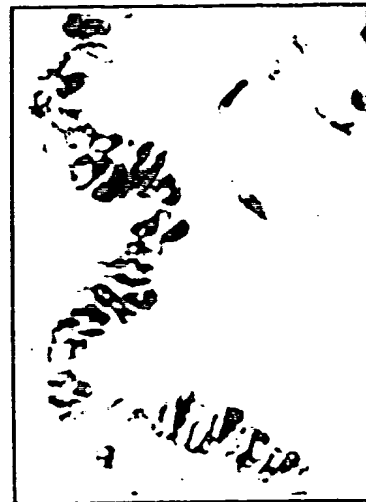


FIGURE 4C

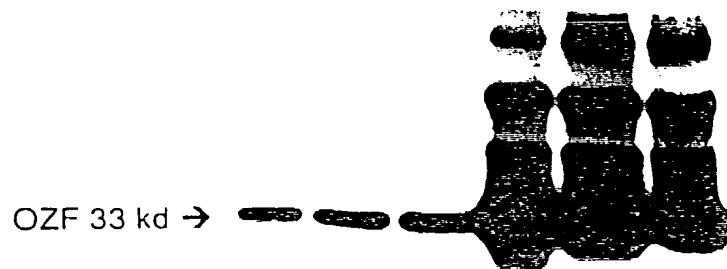
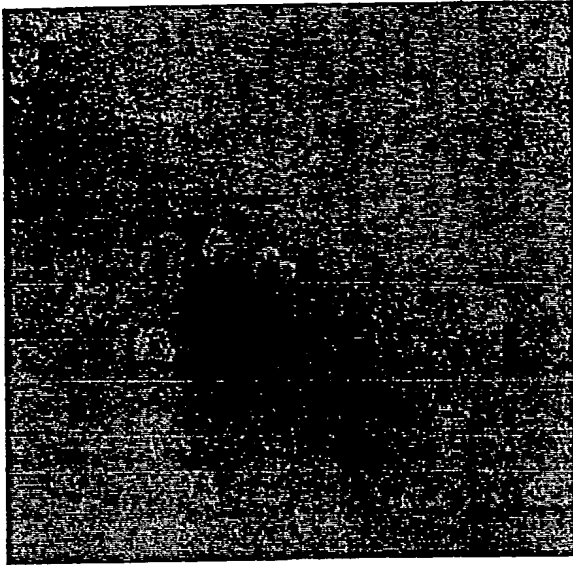
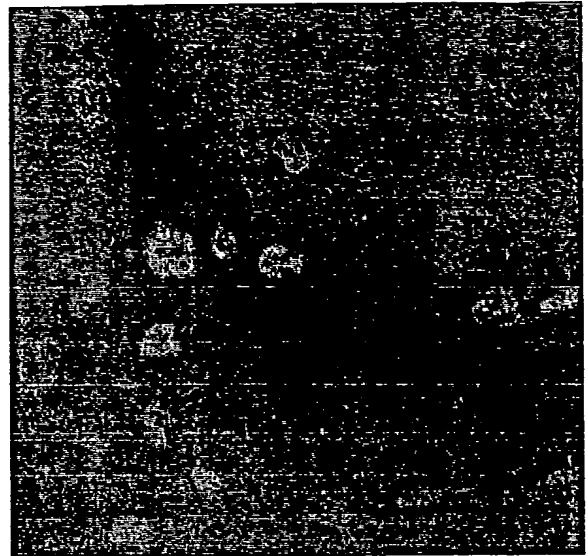


FIGURE 5

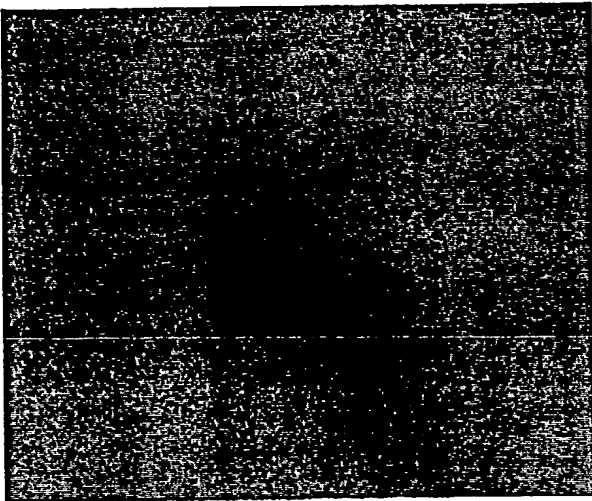




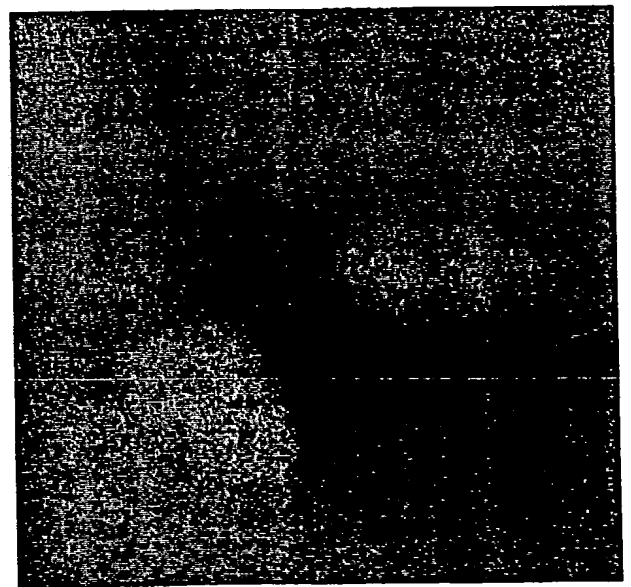
Noyaux marqués au DAPI



Noyaux marqués par anti OZF



Noyaux marqués au DAPI



Noyaux marqués par anti OZF

Pancreas tumoral  
Pancreas saín

C12  
T12

T11

T10

T9

C8  
T8

T7

C6  
T6

C5  
T5

C4

T3

C2

T1

kDa

75

50

35

25

FIGURE 7

ORIGINAL



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**